

The importance of transcriptional regulation on metabolic control in *Escherichia coli*

Doctoral Thesis**Author(s):**

Nanchen-Perrenoud, Annik Magali Violaine

Publication date:

2005

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-005091661>

Rights / license:

In Copyright - Non-Commercial Use Permitted

DISS. ETH No. 16310

The Importance of Transcriptional Regulation on Metabolic Control in *Escherichia coli*

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH
for the degree of
DOCTOR OF SCIENCES

Presented by
ANNIK MAGALI VIOLAINE NANCHEN-PERRENOUD

Ing. Chim. Dipl. EPFL
born on December 14th, 1978
citizen of La Sagne (NE), Switzerland

Accepted on the recommendation of
PD Dr. U. Sauer, examiner
Prof. Dr. W.-D. Hardt, co-examiner
Prof. Dr. U. von Stockar, co-examiner
Prof. Dr. N. Amrhein, chair

2005

SUMMARY

Competition between organisms in ever-changing environments poses a strong selective pressure towards regulated and coordinated gene expression for rapid and optimal responses. Transcriptional regulation is generally considered to be the main mode of regulation in bacteria. In *Escherichia coli*, several gene targets for transcriptional regulation are known for central carbon metabolism, the core of cellular metabolism. However, the extent of transcriptional control on the flux distribution in central metabolism is mostly unknown. Identification of controlling transcript factors and quantitative elucidation of the extent of this control are the topic of this thesis.

Using ^{13}C -labeled glucose experiments with knockout mutants of global metabolic regulators (ArcA, ArcB, Cra, Crp, Cya, Fnr and Mlc), we found that of all existing regulatory links, only ArcA controlled fluxes specifically during aerobic exponential growth (Chapter 2). In the ArcA knockout mutant, the tricarboxylic acid (TCA) cycle was derepressed and this derepression was also observed during anaerobic respiration on nitrate. Moreover, the regulation by ArcA was completely unexpected under aerobic exponential growth because its cognate sensor kinase should not be active.

In contrast to batch cultivations where substrates are abundant, glucose-limited chemostat systems are best to achieve hunger conditions. Chemostat operation is, however, cost and work intensive. Therefore, we developed a mini-scale chemostat system, which enables to work with eight parallel cultivations at costs comparable to shake flask cultivations (Chapter 3). This system was used to study the control of nine global metabolic regulators (ArcA, ArcB, Cra, CreB, CreC, Crp, Cya, Fnr and Mlc) and four global regulators (Hns, OmpR, RpoS and UspA) under glucose-limitation at a dilution rate of 0.1 h^{-1} (Chapter 4). Since glucose concentrations were very low, glucose mediated catabolite repression was absent. The catabolite repression mutants Cra, Crp and Cya had much lower gluconeogenic flux through the PEP-carboxykinase reaction than the wild type. Control by Crp and Cya was, however, two to five times stronger. In addition, Crp and Cya were required for glyoxylate shunt activity in the wild-type under this condition. Therefore, the cAMP-Crp complex controlled operation of the complete PEP-glyoxylate cycle, which is an alternative to the TCA cycle in slow growing *E. coli*. Two global regulators, Hns and RpoS, also exerted a specific or unspecific control on TCA cycle operation. Notably, no gene target in the TCA cycle is known for Hns.

Regulation of central carbon metabolism differed substantially between excess and suboptimal supply of nutrient. However, in both cases initial glucose catabolism was not controlled by any chosen regulator. A stepwise increase in the relative pentose phosphate (PP) pathway flux however, was observed at a dilution rate of 0.2h^{-1} . This variation was not related to the cellular demand for the anabolic reduction equivalent NADPH (Chapter 3). Are other transcriptional regulators then controlling this initial glucose catabolism? To address this question we performed a ^{13}C -flux analysis for 92 knockout mutants, 52 of which were transcriptional regulators (Chapter 6). Only when the PP pathway or NADPH production was directly affected, did this initial flux distribution vary. In addition, even though biomass yields and growth rates varied more than two fold, they did not affect this initial splitting. Therefore, initial glucose catabolism was rigid to genetic modifications and transcriptional regulation. Moreover, similarly to *Bacillus subtilis*, growth of wild type *E. coli* was found to be suboptimal on its preferred carbon source, because, among others, mutants of transcriptional regulators of flagella synthesis or stress responses were found to grow at higher rates and/or yield on glucose than their parent strain.

In chapter 5 we took the first steps towards dynamic flux analysis using intracellular amino acids. We show that experiments with dynamics of about 0.2 doublings could be analyzed using this free pool. Therefore, one could envisage studying transient conditions such as the shift from the exponential to stationary growth phase.

Suboptimal growth is often found in knockout mutants of metabolic genes, but given time to evolve, near wild-type phenotypes might be recovered. In Chapter 7 we studied the mechanisms that underly such adaptive evolution of phosphoglucose isomerase, phosphoenolpyruvate carboxylase and triose phosphate isomerase mutants. Flux analysis of the unevolved and evolved strains revealed that the primary effect of evolution was to improve the capacity of existing pathways. In some cases, initial response to the deletion was lost after adaptive evolution. Global transcript analysis of the evolved knockout mutants then revealed that the activation of latent pathways and large changes in the TCA cycle flux resulted from genetic modifications, as fluxes and gene expression correlated. On the other hand, flux alterations in all other central metabolic pathways were apparently not due to transcriptional regulation.

RÉSUMÉ

La compétition entre micro-organismes dans des milieux environnementaux fluctuants a pour conséquence la sélection d'organismes qui répondent de manière rapide et optimale aux changements grâce à une expression génétique coordonnée. La régulation transcriptionnelle est généralement considérée comme le mode principal de régulation dans les bactéries. Pour *Escherichia coli*, plusieurs gènes du métabolisme central du carbone, qui est le cœur du métabolisme cellulaire, sont des cibles des régulateurs transcriptionnels. L'importance de la régulation transcriptionnelle pour le contrôle de la distribution des flux dans le métabolisme central est cependant inconnue. L'identification des régulateurs exerçant un contrôle sur cette distribution ainsi que la quantification de ce contrôle sont les sujets de cette thèse.

Au travers d'expériences au glucose marqué (^{13}C -glucose) avec des mutants knockout des régulateurs métaboliques globaux (ArcA, ArcB, Cra, Crp, Cya, Fnr et Mlc), nous avons pu établir qu'un seul de ces régulateurs (ArcA) contrôle le flux de manière spécifique pendant la croissance aérobie exponentielle (Chapitre 2). En effet, ArcA réprime le cycle de Krebs pendant la croissance aérobie ainsi que durant la respiration anaérobie avec du nitrate comme accepteur d'électrons. La régulation engendrée par ArcA était inattendue, puisqu'en présence d'oxygène le partenaire d'ArcA, responsable de son activation par phosphorylation, ne devrait pas être actif.

Contrairement aux cultures en batch qui imposent une concentration de glucose abondante, les systèmes de chemostat sont appropriés pour obtenir des conditions de faim. Etant donné que la culture en chemostat est coûteuse et laborieuse, nous avons développé un système de mini-chemostat qui permet de travailler avec 8 cultures en parallèle à des coûts réduits (Chapitre 3). Ce système a été utilisé pour étudier le contrôle exercé par neuf régulateurs métaboliques globaux (ArcA, ArcB, Cra, CreB, CreC, Crp, Cya, Fnr et Mlc) et quatre régulateurs globaux (Hns, OmpR, RpoS et UspA) pour des cultures limitées par la concentration de glucose poussant à une vitesse de 0.1h^{-1} (Chapitre 4). Du fait d'une concentration de glucose faible, la régulation par Cra, Crp et Cya était possible et le flux gluconéogénique induit par la phosphoenolpyruvate (PEP) carboxykinase était réduit dans les mutants Cra, Crp et Cya. La présence de Crp et Cya était de plus requise pour obtenir un flux à travers le cycle glyoxylique. Dès lors le cycle du PEP-glyoxylate, une alternative au cycle de Krebs, était contrôlé par Crp et Cya. Deux régulateurs globaux, Hns et RpoS, exerçaient un contrôle, spécifique ou non, sur le cycle de Krebs. Il est à relever qu'aucune régulation transcriptionnelle des gènes du cycle de Krebs par Hns n'est connue.

La régulation du métabolisme central du carbone différait de manière significative en présence d'un excès ou d'une carence en nutriment, mais dans aucun cas le catabolisme initial du glucose était contrôlé par les régulateurs analysés. Cependant, par rapport à la consommation de glucose, le flux relatif au travers du cycle des pentoses augmenta de manière subite lorsque la vitesse de croissance était de 0.2h^{-1} (Chapitre 3). Cette variation n'était pas causée par une augmentation de la demande en NADPH. D'autres régulateurs contrôlent-ils le catabolisme initial du glucose ? Afin de répondre à cette question nous avons fait des analyses de flux basées sur du ^{13}C -glucose pour 92 mutants auxquels il manquait un gène qui, pour 52 de ces mutants, codait un régulateur transcriptionnel (Chapitre 6). La distribution de flux pour le catabolisme initial du glucose variait seulement quand le cycle du pentose ou la production de NADPH étaient directement affectés. Cette distribution était donc rigide face aux différentes mutations et n'était contrôlée par aucun des 52 régulateurs transcriptionnels étudiés. Comme pour *Bacillus subtilis*, la croissance de la souche parentale d'*E. coli* n'était pas optimale en présence de glucose, sa source de carbone préférentielle puisque des mutants affectés dans la synthèse des flagelles ou dans les réponses à des stress poussaient avec une vitesse de croissance et/ou un rendement en biomasse plus élevé que leur parent.

Au Chapitre 5 nous avons fait des études préliminaires ayant pour but l'analyse dynamique de flux basée sur les acides aminés intracellulaires libres. Nous avons montré que l'analyse de ces acides aminés permettait de conduire des expériences avec une dynamique de 0.2 dédoublement cellulaire. On pourrait donc envisager l'étude de conditions transitoires telle que le passage de la phase exponentielle à la phase stationnaire.

Une croissance non-optimale est fréquemment observée lorsque des gènes du métabolisme central sont supprimés. Si on laisse le temps aux mutants d'évoluer, un phénotype proche de celui du parent peut être retrouvé. Dans le Chapitre 7, nous avons étudié les mécanismes à la base de cette adaptation évolutive pour des mutants de la phosphoglucose isomérase, de la PEP carboxylase et de la triose isomérase. L'analyse de flux de souches non-évoluées et évoluées a montré que l'effet premier de l'évolution est d'augmenter la capacité des voies métaboliques existantes, mais la réponse initiale à la mutation était parfois perdue pendant le processus d'évolution. Une analyse du transcriptome des mutants évolués a révélée qu'une corrélation entre les modifications de flux et l'expression génique existe pour l'activation des voies métaboliques latentes ainsi que pour les changements importants de flux du cycle de Krebs, mais pas pour les autres voies métaboliques.